

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日 1998年10月 2日  
Date of Application:

出願番号 平成10年特許願第296139号  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 1998-296139]

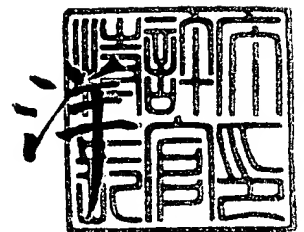
願人 株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所  
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2005年 1月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY



【書類名】 特許願

【整理番号】 SNMFP98379

【提出日】 平成10年10月 2日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 C12N 5/10

【発明の名称】 樹立細胞

【請求項の数】 5

【発明者】

    【住所又は居所】 宮城県仙台市太白区三神峰 1 丁目 3 番地 3 - 5 0 1 号

    【氏名】 細谷 健一

【発明者】

    【住所又は居所】 宮城県仙台市泉区明石南 2 - 1 - 5

    【氏名】 寺崎 哲也

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県川越市今福 1 6 7 2 - 1 - 7 1 9

    【氏名】 上田 正次

【発明者】

    【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区八幡 5 - 3 - 1 0 - 4 0 2

    【氏名】 帯刀 益夫

【特許出願人】

    【識別番号】 395007255

    【氏名又は名称】 株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所

【代理人】

    【識別番号】 100090941

    【氏名又は名称】 藤野 清也

    【電話番号】 3226-6671

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 014834

    【納付金額】 21,000円



【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【物件名】	受託証	1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 樹立細胞

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 脈絡叢上皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseが局在する樹立細胞。

【請求項 2】 FERM BP-6508である、請求項 1 記載の樹立細胞。

【請求項 3】 SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脈絡叢上皮組織をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して不死化細胞を得ることを特徴とする温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseが局在する、不死化細胞の樹立方法。

【請求項 4】 トランスジェニック動物としてラットを用いる請求項 3 記載の不死化細胞の樹立方法。

【請求項 5】 SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脈絡叢上皮組織をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して得られる、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseが局在する樹立細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、脈絡叢上皮細胞由来の樹立細胞に関する。本発明により得られる樹立細胞は、脳の栄養代謝研究、脳内への薬物透過研究や脳脊髄での物質代謝や透過の防御機構の研究に活用することできる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝及び恒常性機能障害に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発の細胞レベルでの研究に有用である。

【0002】

**【従来の技術】**

従来、医薬品の安全性や有効性を精査する試験は、主に動物を用いて行なわれていた。しかし、動物愛護の観点から大量の動物を使用することを避け、培養細胞等を用いて試験管内で医薬品の有効性や安全性を試験する試験技術の実用レベルでの活用が試みられている。例えば、生体組織から採取した初代細胞や無限増殖する樹立培養細胞株を用いる方法で予め試験した後に動物試験を行なう試みがなされている。しかし、初代細胞は初期段階ではよく増殖するが、継代とともに次第に増殖が停止し、やがては死滅する（この現象を細胞老化と呼ぶ）。更に、初代細胞は生体組織から採取する度にその特性が異なることに加え、その細胞特性も継代とともに変化することが指摘されている。特に、増殖速度が非常に遅い場合や微小器官に由来する場合には試験に供するに足る初代細胞を得ることは非常に難しい。

**【0003】**

一方、初代細胞の継代を重ねるなかで、細胞老化を免れて無限増殖する能力を獲得した樹立細胞株では、安定して均一の特性を持つが、この様な細胞株の多くはその細胞が生体において本来有していた形態や機能の一部或いはその全てを喪失しているため、この様な細胞株を用いた場合には、その細胞株の由来する組織での本来の特性を正確に反映することは難しかった。

**【0004】**

そこで、初代細胞にras やc-myc 等の発癌遺伝子、アデノウイルスのE1A 遺伝子、SV40ウイルスのラージT抗原遺伝子、ヒトパピローマウイルスのHPV16 遺伝子等を導入して細胞を形質転換し、初代細胞の有する活発な増殖能を継続的に保持し、しかも継代することによってもその細胞固有の特性を喪失しない不死化細胞を樹立する試みがなされている。ところが、この様な不死化細胞においても対象とする臓器によっては、その初代細胞を調製し、これらの癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を導入する時点で、すでに幾つかの機能を喪失するため、本来の機能を保持する厳密な意味での不死化細胞の取得は困難であった。特に、増殖速度が非常に遅い場合や微小器官に由来する場合の初代細胞を調製して株化することは極めて困難であった。

## 【0005】

これに対し、近年確立された動物個体への遺伝子導入技術を用いて、個々の細胞に癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を導入するかわりに、これらの遺伝子を安定的に染色体に組み込んだ遺伝子導入動物を作出し、個体の発生時点において既に癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を細胞の中に保有する動物の臓器から初代細胞を調製して、これを継代することにより不死化細胞を樹立する方法が報告されている。特に、SV40の温度感受性突然変異株tsA58 のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは、その臓器から不死化細胞を容易に得ることができ、得られた細胞の増殖や分化形質の発現を温度を変えることにより操作することができるため非常に有効である (Noble M. et al. (1995) Transgenic Research 4, 215-225 ; Obinata M. (1997) Genes to Cells 2, 235-244)。マウスに比べ体重が約10倍あるラットは、細胞樹立に供する細胞を各種臓器から取得するうえで、特に、脳内の微小器官に由来する細胞を株化する場合には、容易に組織を分離して多数の細胞を得ることができるため有利である。そこで、各種臓器から不死化細胞を容易に得ることができ、得られた細胞の増殖や分化形質の発現が温度を変えることにより操作することができる不死化細胞の樹立に有効な SV40 の温度感受性突然変異株tsA58 のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットを作出した。

## 【0006】

一方、神経作用性の薬物の血液脳脊髄関門防御機構に対する作用機作の研究において、動物愛護の観点から動物試験に替わる脈絡叢上皮細胞の初代細胞を用いる方法が試みられている。この場合には、試験に供するに足る細胞を恒常的に小型実験動物から得ることが難しいため、これに替わる有効な細胞株が切望されていた。

## 【0007】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意研究の結果、不死化遺伝子を導入したトランスジェニックラットの脳の脈絡叢から上皮細胞株を分離し、不死化細胞を樹立するに至った。従って本発明は、脈絡叢上皮細胞由来であって温度感受性

SV40 ラージ T 抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase 及び GLUT-1 輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase が局在する樹立細胞を得ることを課題とする。

また、本発明は、SV40 温度感受性突然変異体 tsA58 のラージ T 抗原遺伝子を用いて、このような不死化細胞を樹立する方法を提供することを課題とする。

#### 【 0 0 0 8 】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、脈絡叢上皮細胞由来の樹立細胞に関する。詳しくは、温度感受性 S V40 ラージ T 抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase 及び GLUT-1 輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase が局在する樹立細胞に関する。このような樹立細胞としては FERM BP-6508 を例示することができる。

また、本発明は、SV40 温度感受性突然変異株 tsA58 のラージ T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脈絡叢組織をプロテアーゼ処理し、得られる細胞の中から上皮細胞様に敷石状の形態を示す細胞を継代培養することよりなる不死化細胞の樹立方法に関する。このようなトランスジェニック動物としてはラットを例示することができる。

さらに本発明は、このようにして樹立された細胞に関する。

本発明により得られる樹立細胞は、多孔性平面膜上で単層培養すると細胞が相互に結合して閉鎖帯を形成し、表裏極性をもつ血液脳脊髄液関門を試験管内で再構築することができるため、脳の栄養代謝研究、脳内への薬物透過研究、脳脊髄での物質代謝あるいは透過の防御機構の研究に活用することができる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝、恒常性機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

#### 【 0 0 0 9 】

##### 【発明の実施の形態】

本発明で使用する SV40 の温度感受性突然変異株 tsA58 のラージ T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットは、以下のように得ることができる。即ち、

まず、SV40の温度感受性突然変異株tsA58 のラージT抗原遺伝子を、例えば、SV40の複製起点(ori) を欠失させたtsA58ori(-)-2 株の全ゲノムDNAを制限酵素BamHIで開環してpBR322に導入したプラスミドpSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991)) を常法に従い大腸菌内で大量に増幅させる。このようにして調製したプラスミドを制限酵素BamHI で切断してベクター部位を除去する。このようにして得られた tsA58のラージT抗原遺伝子を持つDNA(5,240bp)には、ラージT抗原遺伝子のプロモーターが内在するため、このDNAを導入したラットにおいては、その全ての体細胞においてこの遺伝子(tsA58のラージT抗原遺伝子) が発現することになる。次に、この様にして得られたDNAを常法に従いラットの全能性細胞に導入して温度感受性ラージT抗原遺伝子を全ての細胞内に有する遺伝子導入ラットを作出する。全能性細胞としては、受精卵や初期胚のほか多分化能を有するES細胞があげられる。この様な卵子や培養細胞へのDNA導入法はマイクロインジェクション法、電気パルス法、リボソーム法、リン酸カルシウム法等が利用できる。更に、所望する本遺伝子を導入した培養細胞の核を除核未受精卵に移植して初期化すること(核移植)で卵子に本遺伝子を導入することができる。しかし、遺伝子導入ラットを得る効率からは、現在のところ前核期受精卵の雄性前核に本遺伝子をマイクロインジェクションして得られる卵子を仮親の卵管に移植して産仔を得た後、注入遺伝子を持つ産仔を選出し、安定的に本遺伝子が組み込まれた個体を得ることで、個体発生時にすでにtsA58 のラージT抗原遺伝子が各組織の細胞の染色体に組み込まれた遺伝子導入ラットを効率よく作出することができる。

#### 【0010】

次に、この様にして作出した遺伝子導入ラットの各臓器から常法に従い細胞(初代細胞)を取り出して継代培養を繰り返すことで不死化細胞を調製することができる。得られた細胞株は33~37℃において永久的増殖能を持ち、39℃においては増殖を停止するため細胞固有の分化形質の発現を制御することができるという特色を持つ。このラットの脳を摘出して脈絡叢を採取する。細切した脈絡叢をトリプシン/EDTA で処理して細胞を遊離させ、血清を添加した培養液を加えて、酵素反応を停止させた後、細胞は遠心により回収し、培養液に分散させ、更に、遠



心して回収する操作を繰り返して洗浄する。得られた細胞を培養液に分散して培養プレートに播種し、33℃で培養し、3回の継代の後コロニー形成を行い、ペニシリンカップを用いて上皮細胞特有の敷石状の形態を示す増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離する。この操作を2回行うことで、単細胞に由来する細胞株を単離する。得られた各細胞株について免疫染色を行い、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体の細胞膜上の局在性を、共焦点レーザー顕微鏡で検定して細胞を同定する。得られた細胞株はラージT抗原を発現し、50回の継代後も33℃において良好な増殖性を維持し、さらに $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseとGLUT-1輸送担体の発現を認め、特に単層培養したときに他の上皮細胞では側底膜側（漿膜側）に存在する $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseが頂側膜（apical）側の細胞膜上に局在する細胞株である。

#### 【0011】

##### 【実施例】

以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示したのみであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

#### 【0012】

##### 【実施例1】

##### トランスジェニックラットの作出

SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のDNAを導入したトランスジェニックラットは、下記の手順で作出した。

##### ①導入遺伝子の調製

マイクロインジェクションにはSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のDNAを使用した。このDNAは tsA58のゲノムDNAを制限酵素 BamHIで開環し、pBR322のBamHI 部位に導入し、Sfi I 配列をSac IIに変換してSV40の複製起点(ori)を欠失するori(-)としたDNAクローンpSV tsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991) Fig.1 参照) から常法に従い調製した。即ち、大腸菌内で増幅させて得たプラスミドDNAのpSV tsA58 ori(-)-2を制限酵素 BamH I(宝酒造社製)で消化した後、アガロースゲル電気泳動(1% gel; ベーリンガー社製)を行ってベクター部分を分離した5240bpの tsA58のDNA(直鎖状DNA断片)をゲルから切り出した。アガラーゼ処理(0.6 unit/100mgゲル: Ag

arase ; ベーリンガー社製) によりゲルを溶解した後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿処理を行いDNAを回収した。回収した精製DNAをTEバッファー (1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH 7.6) に溶解して 170  $\mu$ g/mLの精製DNA溶液を得た。このDNA溶液を注入用バッファー (0.1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH 7.6) で 5  $\mu$ g/mLとなるように希釈して注入用DNA溶液を調製した。尚、調製したDNA溶液は注入操作まで -20℃で保存した。

### 【0013】

#### ②トランスジェニックラットの作出

ラット前核期受精卵への上記①で調製した注入用DNA溶液のマイクロインジェクションは下記の要領で行った。性成熟した8週齢のウイスター (Wistar) ラットを明暗サイクル12時間 (4:00~16:00 を明時間)、温度23 $\pm$ 2℃、湿度55 $\pm$ 5%で飼育し、膣スミアにより雌の性周期を観察して、ホルモン処理日を選択した。先ず、雌ラットに150IU/kgの妊馬血清性腺刺激ホルモン〔日本ゼンヤク: PMS 全葉 (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG)〕を腹腔内投与し、その48時間後に75IU/kg のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン〔三共臓器: プベローゲン (human chorionic gonadotropin; hCG)〕を投与して過剰排卵処理を行った後、雄との同居により交配を行った。hCG 投与32時間後に卵管灌流により前核期受精卵を採取した。卵管灌流及び卵の培養にはmKRB液 (Toyoda Y. and Chang M.C., J. Reprod. Fertil., 36, 9-22 (1974))を使用した。採取した受精卵を 0.1% ヒアルロニダーゼ (シグマ社製: Hyaluronidase TypeI-S) を含むmKRB液中で37℃、5分間の酵素処理を行い卵丘細胞を除去した後、mKRB液で3回洗浄して酵素を除去し、DNA注入操作までCO<sub>2</sub>-インキュベーター内 (5%CO<sub>2</sub>-95%Air, 37℃, 飽和湿度) に保存した。この様にして準備したラット受精卵の雄性前核にDNA溶液を注入した。注入操作した228 個の卵を9匹の仮親に移植して出産させ80匹の産仔を得た。注入DNAのラットへの導入は、離乳直後に断尾して得た尾より調製したDNAをPCR 法により検定〔使用プライマー; tsA58-1A, 5'-TCCTAATGTGCAGTCAGGTG-3' (1365 ~1384部位に相当), tsA58-1B, 5'-ATGACGAGCTTTGGCACTTG-3' (1571~1590部位に相当)〕した。その結果、遺伝子の導入を認めた20匹 (雄6匹、雌8匹、性別不明6匹) の産仔を得た。これらの中から性成熟期間を経過

する12週齢まで生存した11ラインのトランスジェニックラット（雄ライン: #07-2, #07-5, #09-6, #12-3, #19-5, 雌ライン: #09-7, #11-6, #12-5, #12-7, #18-5, #19-8）を得た。これらのG<sub>0</sub>世代のトランスジェニックラットとウイスターラットを交配し、雄ファウンダーの2ライン（#07-2, #07-5）と雌ファウンダーの3ライン（#09-7, #11-6, #19-8）において次世代以降への遺伝子の伝達を確認した。 【0014】

## 【実施例2】

### 脈絡叢上皮細胞の分離

実施例1で得られた、SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラット（1匹）より、クリーンベンチ内で清浄に脳を摘出した。得られた脳の左右の側脳室の内側壁から第三脳室の上壁まで続く脈絡叢を採取し、PBSでよく洗浄した後、2 mLの氷冷したPBS 中で組織を1～2 mm<sup>3</sup> に細切した。細切した組織を1 mLの10X トリプシン/EDTA 溶液（0.5% Trypsin/5.3mM EDTA; Gibco BRL社製）に懸濁して酵素処理（37℃, 20分間）を行った。ときどき軽く攪拌することで細切した組織を分散させた。得られた細胞を培養液（10% FCS, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ/mL streptomycin sulfateを含むDMEM）で洗浄した。次に、2 mLの培養液に分散して1枚の35mm φ 培養シャーレー（Falcon; Becton Dickinson社製）に播種し、33℃の炭酸ガス培養器（5% CO<sub>2</sub>-95% Air, 飽和湿度）内で培養（初代培養）した。培地を1週間に2回交換し、継代はトリプシン/EDTA 液（0.05% Trypsin/0.53mM EDTA; Gibco BRL社製）を用いておよそ1週間隔で行った。3回の継代の後、10<sup>2</sup>～10<sup>3</sup> 個の細胞を10cm φ 培養シャーレーに播種して33℃の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。培地を1週間に2回交換し、7～10日後に上皮細胞特有の敷石状の形態を示す細胞からなるコロニーを形成した増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリンカップを用いて周囲の細胞から単離し、得られた細胞を再び10cm φ 培養シャーレーに播種して33℃の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。ペニシリンカップを用いて増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離して5種の細胞株（TR-CSFB1, TR-CSFB2, TR-CSFB3, TR-CSFB4, TR-CSFB5）を得た。

この TR-CSFB 3 株を工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターに寄託した。受託番号は FERM BP-6508 である。

### 【0015】

#### 【実施例 3】

##### ラージ T 抗原タンパク質の確認

実施例 2 で得られた 5 種の細胞株のラージ T 抗原蛋白質を、ウエスタンブロット法（実験医学別冊バイオマニュアル UP シリーズ「分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコル」 108～115 頁，羊土社，1995 年発行）により検討した。5 種の細胞株（継代数：10）を 90mm  $\phi$  培養シャーレーで飽和まで培養した。回収した細胞を 1 mL の 3 % SDS-PBS (pH7.4) で可溶化した後、遠心 (10,000rpm, 10 分間) して不溶画分を除去した後、フラッドフォード法 (BIO-RAD 社製 プロテインアッセイキット II を使用) で総蛋白質量を定量した。それぞれ 20  $\mu$ g の蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。3 % スキムミルク溶液でブロッキングしたニトロセルロース膜に 1 次抗体として抗 SV40 ラージ T 抗原マウス抗体 (DP02-C、CALBIOCHEM 社製) を、2 次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham 社製) A を反応させ、ラージ T 抗原蛋白質特異的な反応をアマシャム社製 ECL ウエスタンブローディング検出システム (RPN2106M1) を用いて検出した。結果を表 1 に示す。この結果、得られた 5 種の細胞株全てにおいてラージ T 抗原蛋白質を確認した。

### 【0016】

【表 1】

細胞株	TR-CSFB1	TR-CSFB2	TR-CSFB3	TR-CSFB4	TR-CSFB5
T 抗原	+	+	+	+	+

### 【0017】

#### 【実施例 4】

##### Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase と GLUT-1 輸送担体の確認

得られた各細胞株を単層培養し、細胞膜に発現された $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体を免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて確認した。実施例2で得られた細胞株TR-CSFBを35mmφディッシュ (Falcon) のコラーゲンコートカバーガラスの上に培養した。培養液を除去し、細胞をPBSで洗浄した後、4 mLの固定液 (3% paraformaldehyde, 2% sucrose を添加したPBS) を加え室温で15分間放置後、PBSでよく洗浄した。2 mLのブロッキング液 (Block Ace; 大日本製薬社製) を加え、37℃で1時間放置してブロッキングした後、1次抗体 (抗 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase  $\beta 2$  ウサギ抗体; UBI 社製、又は抗GLUT-1ウサギ抗体; Chemicon社製) を室温で1時間反応させた。PBSで4回洗浄後、2次抗体 (FITCラベル抗ウサギIgG; Capel社製) を室温で1時間反応させ、PBSで4回洗浄した。最後に、ラベル化した細胞をグリセリン封入液 (90% glycerolとなるようにPBSを加えた後、Perma Fluor (Lipshaw社製) を0.1(V/V)% 添加したもの) で封入し、マニキュアにてカバーガラスの周囲を封入した。観察は、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (CLSM; Zwiss LSM 410, Zwiss社製) で行なった。この結果、細胞株 TR-CSFB3 で $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase (図1) 及びGLUT-1の発現を認め、特に、他の上皮細胞では側底膜側 (漿膜側) に存在する $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseが頂側膜 (apical) 側の細胞膜上に局在することから、得られた細胞株が脈絡叢上皮細胞株であると同定した。尚、他の細胞株においても同様の結果が得られた。

【0018】

#### 【実施例5】

##### プロリン輸送機能の確認

得られた細胞のL-プロリンの輸送に対する濃度依存性を調べてL-プロリンの輸送能を求め、既報の脈絡叢におけるL-プロリンの輸送能と比較することで、得られた細胞株が脈絡叢上皮細胞としての機能を保持することを確認した。

実施例2で得られた細胞株TR-CSFB3を24穴細胞培養用プレートに $3 \times 10^5$ /ウェル/mL となるように播き、33℃の炭酸ガス培養器で24時間培養して細胞をコンフルエントにした。まず、培地を吸引して除去した後、37℃に温めた uptake buffer (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.4 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM Hepes, 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  の溶液を5%  $\text{CO}_2$ -95%  $\text{O}_2$  で20分間バブリングし

て NaOH で pH7.4に調整) で細胞を洗浄した。185KBq/mL の  $[^3\text{H}]$ -L-proline を含む37℃に温めた0.2 mLの uptake bufferを加えた。ただし、各プロリン濃度の uptake buffer は、非標識体の L-プロリンで0.005, 0.01, 0.05 , 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20mMとなるように調製した。30分間の取り込み反応を行なわせ、細胞を PBSで 3 回洗浄した後、1 mLの 1 %トライトンX-100 を含む 1 mLの PBSを加え、室温で一晩静置して可溶化し、液体シンチレーションカウンター (Beckmann社製 LS-6500) を用いて放射活性を測定した。又、タンパク質量をBio-Rad 社製 DC プロテインアッセイキットを用いて測定した。L-プロリンの濃度に対する取り込み速度のプロット式 ( $V = V_{\text{max}} \times [S] / (K_m + [S])$ );  $V_{\text{max}}$  は最大速度定数、 $K_m$  はミカエリス定数、 $[S]$  は基質濃度) を用いて L-プロリンの取り込みの  $K_m$  及び  $V_{\text{max}}$  を非線形最少二乗法プログラムMULTI (Yamaoka K. et al. (1981) J. Pharmacobiodyn., 4, 879-885) を用いて解析した。結果を図 2 に示す。この結果、L-プロリン ( $[^3\text{H}]$ -L-proline) の取り込みは濃度依存的であり、その  $K_m$  値は1.5 mM、 $V_{\text{max}}$  値は2.4 nmol/min/mg protein であった。求めた  $K_m$  値は、家兎脈絡叢での報告された値の1.1 mM (Coben L.A. et al. (1972) Brain Res., 30, 67-82) と近似した。このことから、得られた細胞株が脈絡叢上皮細胞株の機能を保持することを確認した。

【 0 0 1 9 】

#### 【実施例 6】

##### コリン、ウアバインによるプロリン能動輸送の阻害

単離脈絡叢における L-プロリンの取り込みは  $\text{Na}^+$  依存性であることから、得られた細胞株における L-プロリンの取り込みの  $\text{Na}^+$  依存性を確認して、得られた細胞株が脈絡叢上皮細胞としての機能を保持することを、実施例 5 と同様の方法により確認した。ただし  $\text{Na}^+$ -free 条件下でおこなうため uptake buffer の組成中の  $\text{Na}^+$  をすべて coline に置換したものを用いた。又、ウアバインの効果を調べる (ウアバインは  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase の阻害剤であるため、 $\text{Na}^+$  の濃度勾配が消失する) 場合には、1mM ウアバインを添加したトレーサーを含む uptake buffer を使用した。いずれも30分間の反応を行なった。結果を図 3 に示す。 $\text{Na}^+$ -free 条件下では L-プロリンの取り込みが98%阻害された。又、1 mMウアバインにより

L-プロリンの取り込みが56%の阻害された。この結果から、細胞株TR-CSFB3におけるL-プロリンの取り込みは $\text{Na}^+$  依存性であることが示された。このことから、得られた細胞株が脈絡叢上皮細胞株の機能を保持することを確認した。

#### 【0020】

##### 【発明の効果】

本発明により、脈絡叢上皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPaseが局在する樹立細胞、及びSV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトラスジェニック動物の脈絡叢組織をプロテアーゼ処理することの特徴とする、不死化細胞の樹立方法が提供される。

本発明により得られる樹立細胞は、多孔性平面膜上で単層培養すると細胞が相互に結合して閉鎖帯を形成し、表裏極性をもつ血液脳脊髄液関門を試験管内で再構築することができるため、脳の栄養代謝研究、脳内への薬物透過研究、脳脊髄での物質代謝あるいは透過の防御機構の研究等に活用することできる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝あるいは恒常性機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

実施例4の樹立した細胞株(TR-CSFB3)の $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPaseの共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡写真を示す。

上の写真は上面からみた顕微鏡写真で $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase及び GLUT-1 の発現がみられる。下の写真は、断面の顕微鏡写真で頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPaseが局在している。

##### 【図2】

実施例5の樹立した細胞株のプロリン能動輸送能を示す。

##### 【図3】

実施例6の樹立した細胞株のプロリン能動輸送能のコリン、ウアバインによる

阻害を示す。

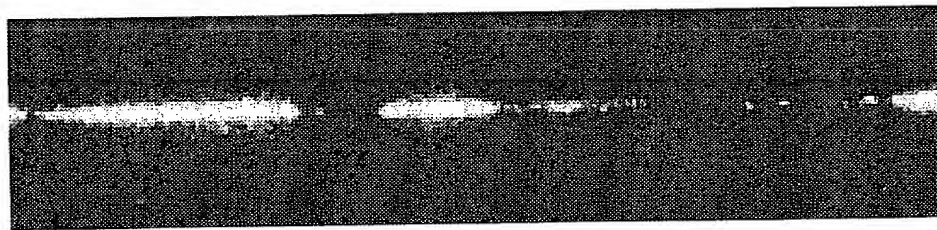
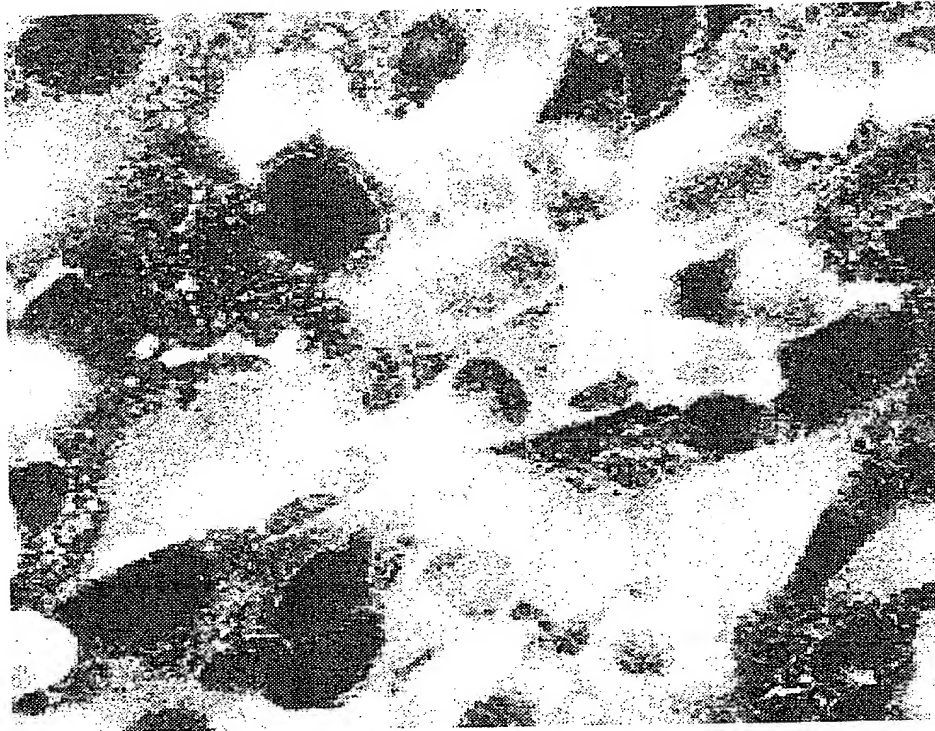


【書類名】

図面

【図1】

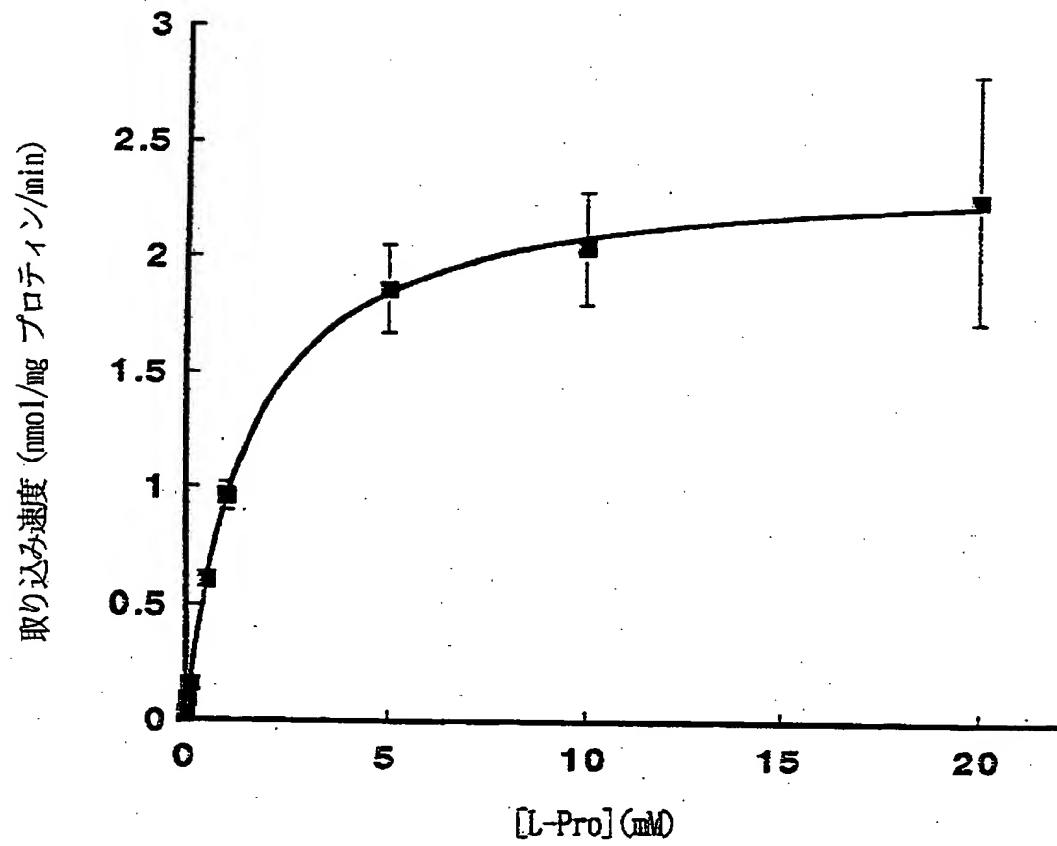
図面代用写真



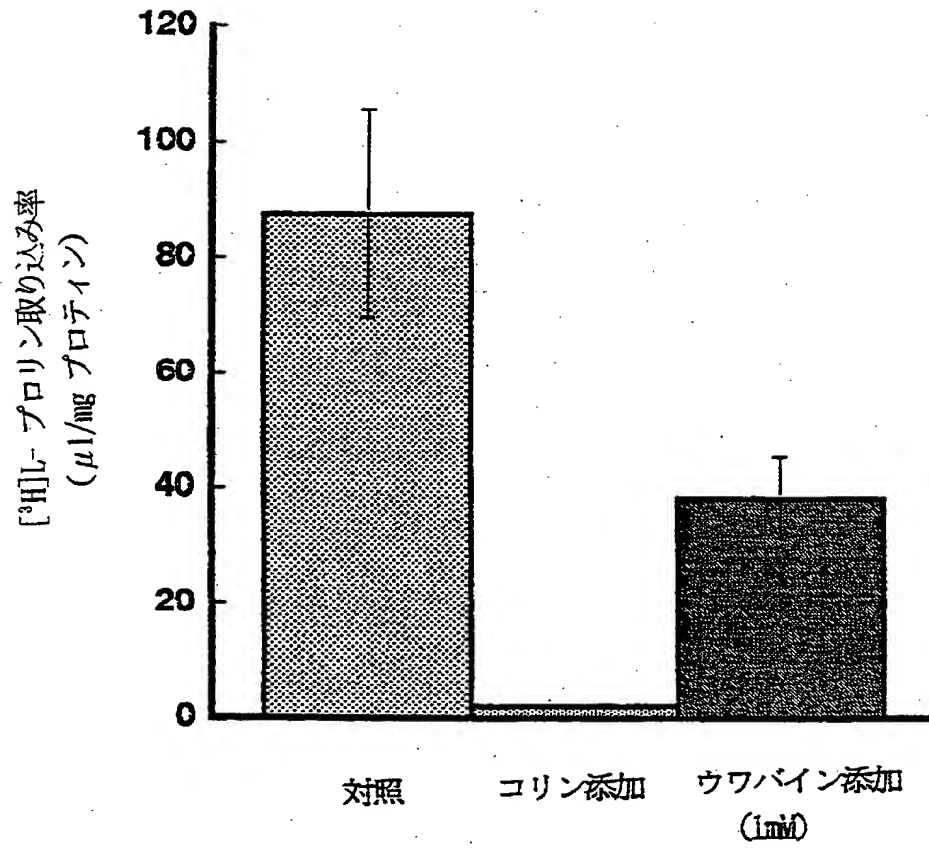
←頂側膜(apical)側

←側底膜(漿膜)側

【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 樹立細胞の提供。

【解決手段】 脈絡叢上皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseが局在する樹立細胞。

SV40温度感受性突然変異株tsA58 のラージT抗原遺伝子を導入したトラスジェニック動物の脈絡叢組織をプロテアーゼ処理し、得られた細胞を継代培養して不死化細胞を樹立する方法。

【効果】 医薬品の安全性及び有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝及び恒常性機能障害に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用。

【選択図】 なし



国際様式 INTERNATIONAL FORM

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブタベスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

## 原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名(名称) 株式会社 ワイエスニューテクノロジー研究  
所 取締役研究所長 上田 正次 殿  
寄託者 あて名 〒 329-0512  
栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林 5  
19番地

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) TR-CSFB3	(受託番号) FERM BP- 6508
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。  <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成10年 9月18日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日(原寄託日)に1欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブタベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Human-Technology 名称: Agency for Industrial Science and Technology 所長 大箸 信一 Dr. Shinichi Oshichi Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番2号 (郵便番号305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成10年(1998) 9月18日	

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【特許出願人】  
【識別番号】 395007255  
【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林 5 1 9 番地  
【氏名又は名称】 株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100090941  
【住所又は居所】 東京都新宿区四谷 1 丁目 2 番 1 号 三浜ビル 8 階  
藤野特許事務所  
【氏名又は名称】 藤野 清也  
【提出された物件の記事】  
【提出物件名】 原寄託についての受託証 1

特願平 1 0 - 2 9 6 1 3 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 9 5 0 0 7 2 5 5 ]

1. 変更年月日

1 9 9 5 年 3 月 3 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林 5 1 9 番地

氏 名

株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所



## VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Seiya FUJINO, residing at 5-3, Ozuki, Sakae-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 247-0027 Japan, hereby certify that to the best of my knowledge and belief, the attached document is a true translation into English made by me of Japanese Patent Application No. 296139/1998 filed on October 2, 1998.

Seiya Fujino  
(Seiya FUJINO)

27 January, 2005  
Date



【Document Name】 Patent Application

【File Number】 SNMFP98379

【Filing Date】 2 October, 1998

【Address】 Commissioner of Patent Office

Kenji ISAYAMA Esquire

【International Patent Classification】

C12N 5/10

【Title of the Invention】

Established Cells

【Number of claims】 5

【Inventor】

【Address or Residence】

3-501, 3-banchi, Mitsugamimine 1-chome,  
Taihaku-ku, Sendai-shi, Miyagi-ken

【Name】 Kenichi HOSOYA

【Inventor】

【Address or Residence】

2-1-5, Akashiminami, Izumi-ku, Sendai-shi,  
Miyagi-ken

【Name】 Tetsuya TERASAKI

【Inventor】

【Address or Residence】

1672-1-719, Imafuku, Kawagoe-shi,  
Saitama-ken

【Name】 Masatsugu UEDA

【Inventor】

【Address or Residence】

5-3-10-402, Hachiman, Aoba-ku, Sendai-shi,

Miyagi-ken

【Name】 Masuo OBINATA

【Applicant】

【Code Number】 395007255

【Name】 YS New Technology Institute Inc.

【Attorney】

【Code Number】 100090941

【Name】 Seiya FUJINO

【Telehone】 3226-6671

【Charge】

【Deposit Number】 014834

【Amount of Payment】 ¥21,000

【List of Submission】

【Name of Submission】 Specification 1

【Name of Submission】 Drawing 1

【Name of Submission】 Abstract 1

【Name of Submission】 International Deposit 1

【Document Name】 Specification  
【Title of the Invention】 ESTABLISHED CELLS  
【Claims】

【Claim 1】 An established cell derived from choroid plexus epithelial cells, which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, shows localization of  $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase and GLUT-1 transporter in the cell membrane, and when cultured in a monolayer, shows the localization of  $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase in the apical side.

【Claim 2】 The established cell according to claim 1, having a deposition number of FERM BP-6508.

【Claim 3】 A method of establishing an immortalized cell which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, shows localization of  $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase and GLUT-1 transporter in the cell membrane, and when cultured in a monolayer, shows the localization of  $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase in the apical side, the method comprising treating choroid plexus epithelium tissues of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced with protease and subculturing the resulting cells to obtain immortalized cells to obtain immortalized cells.

【Claim 4】 The method of establishing an immortalized cell according to claim 3, wherein the transgenic animal is a rat.

【Claim 5】 An established cell which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, shows localization of  $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase and GLUT-1 transporter in the

cell membrane, and when cultured in a monolayer, shows the localization of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase in the apical side, which is obtained by treating choroid plexus epithelium tissues of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced with protease and subculturing the resulting cells.

#### **【Detailed Description of the Invention】**

**【0001】**

#### **【Technical Field where the Invention Belongs】**

The present invention also relates to established cells derived from choroid plexus epithelial cells of the transgenic animal. The established cells derived from choroid plexus epithelial cells of the present invention are useful for studying nutrition metabolism in the brain, studying permeation of drugs into the brain, and investigating the metabolism or permeation protection mechanism of substances in the cerebrospinal system. These cells are therefore useful in screening drugs regarding the safety and efficacy thereof, and developing methods for diagnosing and treating diseases relating to nutrition metabolism disorders and homeostatic functional disorders of the brain on cellular level studies.

**【0002】**

#### **【Background Art】**

Conventionally, tests for the assessment of safety and efficacy of drugs have mainly been conducted using animals. However, to avoid use of a large number of animals from the viewpoint of animal right, test technologies using cultured

cells for in-vitro assessment of safety and efficacy of drugs are used on a practical level. For example, a technique of first testing using primary culture cells collected from living tissues or established culture cells which can infinitely proliferate, and then testing using animals is employed. The primary culture cells can initially proliferate very well, but the proliferation gradually declines as the subculture advances, and finally cells die out. This phenomenon is called cellular senescence. Furthermore, in addition to the fear that the characteristics of primary culture cells may differ each time they are collected from living tissues, the primary culture cells are said to change the characteristics as the subculture advances. Particularly, when the multiplication rate is very slow or when the cells are derived from a small organ, it is very difficult to obtain a sufficient amount of the primary culture cells for test.

【0003】

On the other hand, established culture cell which have acquired the capability of infinitely proliferating during subcultures of the primary culture cells can maintain stable characteristics. However, most of these cells no longer have part or all of the forms and functions possessed by the cells when they were in a living body. Therefore, it is difficult for such established cells to precisely reflect the original characteristics which the cell lines exhibited in the tissues from which they have been derived.

【0004】

In view of this situation, establishment of immortalized

cells which can continuously maintain an active proliferation capability possessed by the primary culture cells without losing the characteristics inherently possessed by the cells during subculture, has been tried by transforming the cells by introducing oncogenes such as ras and c-myc, E1A gene of adenovirus, large T-antigen gene of SV40 virus, HPV16 gene of human papillomavirus, and the like. Such immortalized cells which are derived from some organs already lose several functions at the time of introducing oncogenes or large T-antigen genes after preparation of a primary culture cell. Thus, acquisition of immortalized cells in the stringent meaning of holding an original function has been difficult. Preparing a primary culture cell and acquiring a cell line has been very difficult, particularly when the multiplication rate is very slow or when the cells are derived from a small organ.

【0005】

To overcome these problems, a method of establishing immortalized cells by applying a recently developed transgenic technology to individual animals has been proposed. Instead of introducing oncogenes or large T-antigen genes into individual cells, according to this method, transgenic animals into which these genes have been introduced in chromosomes in a stable manner are prepared. Then, a primary culture cell is prepared from an organ of these animals which possesses the oncogenes or large T-antigen genes in the cells at the time of development of the individuals. The primary culture cells is subcultured to establish immortalized cells. In particular, immortalized cells are easily available from organs of

transgenic mice into which a large T-antigen gene of a temperature sensitive mutant tsA58 of SV40 has been introduced. The immortalized cells are very useful because proliferation of the resulting cells and expression of the differentiation character can be managed by changing the temperature (Noble M. et al. (1995) Transgenic Research 4, 215-225; Obinata M. (1997) Genes to Cells 2, 235-244) . Rats having a body weight about ten times that of mice are advantageous for preparing cells used for the establishment of cells from various organs, particularly for preparing a cell line originating from small organs such as retinal capillary endothelial cells, because primary culture cells can be easily obtained by separating organs. Therefore, transgenic rats into which a large T-antigen gene of a temperature sensitive mutant tsA58 of SV40 has been introduced, which are useful for establishing immortalized cells due to easy availability from various organs and the capability of controlling the proliferation of the resulting cells and expression of the differentiation character by changing temperatures, had already been produced.

**[0006]**

On the other hand, in research investigating the effect and mechanism of nerve drugs on the blood-cerebrospinal fluid barrier mechanism, a method of using a primary culture cell of choroid plexus epithelial cells in place of animal tests is being developed in view of animal right. In this instance, because it is difficult to constantly obtain a sufficient amount of culture cells for the test from small animals,

effective cell lines usable in place of such culture cells have been strongly desired.

【0007】

【Problems to be Solved by the Invention】

In view of this situation, the present inventors have conducted extensive studies and, as a result, have established immortalized cells by separating an epithelial cell line from the choroid plexus of brain of transgenic rats into which immortalizing genes have been introduced. An object of the present invention is therefore to provide established cells derived from choroid plexus epithelial cells, capable of expressing a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, showing localization of  $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase and GLUT-1 transport carriers in the cell membrane, and when cultured in a monolayer, showing the localization of  $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase in the apical side.

A further object of the present invention is to provide a method of establishing such immortalized cells using a large T-antigen gene of the SV40 temperature sensitive mutant tsA58.

【0008】

【Means to Solve the Problems】

The present invention relates to established cells derived from choroid plexus epithelial cells. Specifically, the present invention relates to established cells expressing a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, showing localization of  $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase and GLUT-1 transport carriers in the cell membrane, and when cultured in a monolayer, showing the localization of  $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase in the apical side. FERM



BP-6508 can be given as such established cells.

The present invention also relates to a method of establishing immortalized cells comprising treating the choroid plexus tissues of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of a temperature sensitive mutant tsA58 of SV40 has been introduced with protease, selecting the cells exhibiting an epithelial cell-like/paving stone-like form from the resulting cells, and subculturing such cells. The rat can be given as an example of such a transgenic animal.

Furthermore, the present invention relates to the established cells obtained using such a method.

Due to the capability of forming tight junction among cells when cultured in a mono-layer on a porous flat membrane and the capability of reconstructing the blood-cerebrospinal fluid barrier having a inside-and-outside polarity in vitro, the established cells obtained by the present invention are useful for studying nutrition metabolism of the brain, studying permeation of drugs into the brain, and investigating the metabolism or permeation protection mechanism of substances in the cerebrospinal system. These cells are therefore useful in screening drugs regarding the safety and efficacy thereof, and developing a method for diagnosing and treating diseases relating to nutrition metabolism disorders and homeostatic functional disorders of the brain on cellular level studies.

**【0009】**

**【Embodiments of the Invention】**

The transgenic rat using in the present invention into

which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced can be obtained as follows. Specifically, a whole genome DNA of tsA58ori(-)-2 which is produced from a large T-antigen gene of a temperature sensitive mutant tsA58 of SV40, for example, with deletion of the SV40 ori (replication origin), is linearized using a restriction endonuclease BamHI, and introduced into pBR322 to obtain a plasmid pSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991)). The plasmid is amplified in *Escherichia coli* in a large amount according to a conventional method. The plasmid thus obtained is cut with a restriction endonuclease BamHI to eliminate a vector region. Because the DNA (5,240 bp) having a large T-antigen gene of tsA58 thus obtained has a promoter of the large T-antigen gene therein, a rat into which the DNA is introduced expresses this gene (the large T-antigen gene of tsA58) in all somatic cells. Next, the resulting DNA is introduced into totipotent cells of rats in accordance with a conventional method to prepare transgenic rats having a temperature sensitive large T-antigen gene in all cells. As a totipotent cell, ES cells having totipotency can be given in addition to fertilized ova and early embryos. A microinjection method, electroporation method, liposome method, calcium phosphate method, and the like can be used for introducing DNA into such ova and cultured cells. Furthermore, the present gene can be introduced into ova by transplanting a nucleus of cultured cells, into which a desired gene of the present invention has been introduced, in enucleation unfertilized ova and initializing the ova (nuclear

transplantation). However, as far as the efficiency of obtaining a transgenic rat is concerned, a transgenic rat having a large T-antigen gene of tsA58 incorporated into chromosomes of cells of each tissue at the time of development of individuals can be efficiently obtained by producing ova through microinjection of the gene of the present invention into male pronucleus of the pronucleus fertilized ova, transplanting the ova into the oviduct of an foster mother to obtain offspring, and selecting the offspring having the injected gene, thereby stably obtaining individuals into which the gene of the present invention has been incorporated.

**【0010】**

Immortalized cells can be prepared by extracting cells (primary cells) from organs of gene-introduced rats thus obtained, and repeating subculture of the cells according to a conventional method. The resulting cells have the capability of permanently proliferating at 33-37°C and terminating the proliferation at 39°C. The brain of this rat is taken out to collect choroid plexus. The choroid plexus cut into pieces is treated with trypsin/EDTA to disperse cells. After terminating the enzymatic reaction by the addition of a culture solution containing serum, the cells are collected by centrifugation and dispersed in a culturesolution. The procedures of centrifugation and dispersion are repeated to wash the cells. The cells thus obtained are dispersed in a culturesolution, inoculated on a culture plate, and incubated at 33°C. After subculturing three generations, colonies are formed. Colonies exhibiting a paving stone-like form inherent to epithelial

cell and a comparatively fast growth rate are isolated from the surrounding cells using a penicillin cup. This procedure is repeated twice to isolate the cell lines originating from a single cell. The cell lines obtained are subjected to immunostaining to confirm localization of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase and GLUT-1 transporter on the cell membrane by using a confocal laser scanning microscopy, whereby the cells are identified. The resulting cell lines express a large T-antigen, maintain excellent proliferating activity after 50 generation subculture at  $33^\circ\text{C}$ , and exhibit expression of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase and GLUT-1 transporter. In particular, when the cells are cultured in a monolayer,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase which is present on the basolateral membrane side (a serous membrane side) in other epithelial cells, is locally present in the apical side of the cell membrane.

【0011】

【Example】

The present invention will now be described in more detail by way of examples, which are given for the purpose of explanation and should not be construed as limiting the present invention.

【0012】

【Example 1】

#### Preparation of transgenic rat

A transgenic rat carrying DNA of an SV40 temperature sensitive mutant tsA58 was prepared according to the following method.

#### ①Preparation of a gene to be introduced

DNA of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 was used for microinjection. The genome DNA of tsA58 was linearized using a restriction endonuclease BamHI and introduced into the BamH site of pBR322 to convert the Sfi I sequence to the SacII sequence, thereby obtaining a DNA clone pSVtsA58 ori(-)-2 with deletion of the SV40 ori site (replication origin) (See Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991), Figure 1). The DNA was prepared from the pSVtsA58 ori(-)-2 according to a conventional method. Specifically, the pSVtsA58 ori(-)-2 of plasmid DNA obtained by amplification in *Escherichia coli*. was digested using a restriction endonucleases BamHI (made by Takara Shuzo Co., Ltd.) and DNA (Linear DNA fragment) of tsA58 with a length of 5240 bp separated the vector region by agarose gel electrophoresis (1% gel; Boeringer company) were cut out from the gel. The gel was dissolved by agarase treatment (0.6 unit/100 mg gel: Agarase; made by Boeringer Co.). DNA was recovered by phenol-chloroform treatment and ethanol precipitation treatment. The recovered and purified DNA was dissolved in a TE buffer (10 mM Tris-HCl containing 1 mM EDTA, pH 7.6) to obtain a purified DNA solution with a concentration of 170 µg/mL. The DNA solution was diluted with a buffer (10 mM Tris-HCl containing 0.1 mM EDTA, pH 7.6) to a concentration of 5 µg/mL to prepare a DNA solution for microinjection. The resulting DNA solution was stored at -20°C until use for microinjection.

【0013】

## ②Preparation of transgenic rat

Preparation of transgenic rat Microinjection of the DNA

solution prepared in ① above to the rat fertilized ova at pronucleus stage was carried out according to the following procedures. Sexually mature Wistar rats, aged eight weeks, were kept in a condition of a 12 hour light-and-shade cycle (light hours: 4:00-16:00) at  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  and RH  $55\pm 5\%$ . The estrous cycle of female rats was observed by vaginal smear to select the hormonal treating day. A pregnant-mare serum gonadotropic hormone (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG, manufactured by Nippon Zenyaka Co.) was intraperitoneally administered at a dose of 150 IU/kg to female rats. After 48 hours, 75 IU/kg of human chorionic gonadotropic hormone (human chorionic gonadotropin; hCG, manufactured by Sankyo Zoki Co.) was administered thereby effecting superovulation treatment. The female and male rats were mated by being together in a cage. The fertilized ova at pronucleous stage were collected by oviduct perfusion at 32 hours after the hCG administration. A mKRB solution (Toyoda Y. and Chang M.C., J. Reprod. Fertil., 36, 9-22 (1974)) was used for the oviduct perfusion and incubation of ova. The collected (fertilized) ova were treated by an enzyme in an mKRB solution containing 0.1% hyaluronidase (Hyaluronidase Type I-S, made by Sigma Co.) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes to remove cumulus cells. After washing three times with the mKRB solution to remove the enzyme, the fertilized ova were stored in a  $\text{CO}_2$  incubator (5%  $\text{CO}_2$ -95% air,  $37^{\circ}\text{C}$ , saturated humidity) until DNA microinjection. A DNA solution was microinjected into the male pronucleus of the rat (fertilized) ova thus prepared. 228 ova after microinjection were transplanted in nine recipients (foster mothers) and 80

pups were obtained. The integration of the microinjected DNA was analyzed with DNA prepared from tails of the rats immediately after weaning by the PCR method (primers used: tsA58-1A, 5'-TCCTAATGTGCAGTCAGGTG-3' (corresponds to 1365-1384 sites), tsA58-1B, 5'-ATGACGAGCTTTGGCACTTG-3' (corresponds to 1571-1590 sites)). As a result, 20 rats (6 male, 8 female, and 6 unknown sexuality) were identified to have the gene introduced. Among these rats, 11 transgenic rat lines (male lines: #07-2, #07-5, #09-6, #12-3, #19-5, female lines: #09-7, #11-6, #12-5, #12-7, #18-5, #19-8) which survived as long as 12 weeks after elapse of the sexual maturation period were obtained. These G<sub>0</sub> generation transgenic rats were mated with Wistar rats and established 2 lines of male founders (#07-2, #07-5) and 3 lines of female founders (#09-7, #11-6, #19-8), by confirming that the genes was transferred to next generation.

【0014】

【Example 2】

#### Isolation of choroid plexus epithelial cells

In a clean bench, the brain was collected from one transgenic rat carrying a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 obtained in Example 1. The choroid plexus from the inner wall of the right and left ventriculus lateralis through the upper wall of the third ventricle of the brain was collected and thoroughly washed with PBS. The tissue was cut into pieces with a volume of 1-2 mm<sup>3</sup> in 2 mL of ice-cooled PBS. The tissue pieces were suspended into 1 mL of a 10X trypsin/EDTA solution (0.5%

Trypsin, 0.53 mM EDTA; manufactured by Gibco BRL) to digest by the enzyme treatment (37°C, 20 minutes). The tissue pieces were dispersed by gently stirring from time to time. The resulting cells were washed with a culture medium (DEME solution containing 10% FCS, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, and 100 µ/mL streptomycin sulfate). The cells were dispersed in 2 mL of the culture solution and inoculated in a 35mmö culture dish (Falcon, manufactured by Becton Dickinson Co.) and incubated (primary culture) at 33°C in a CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>-95% air, saturated humidity). Subculture was carried out at an interval of about one week using a trypsin/EDTA solution (0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA; manufactured by Gibco BRL) while replacing the medium twice a week. After subculture three times, 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> cells were inoculated in a 10 cmö culture dish and incubated in a CO<sub>2</sub> incubator at 33°C to form colonies. After 7-10 days while replacing the medium twice a week, the colonies consisting of cells having a paving stone-like form inherent to epithelial cells which exhibit a comparatively fast growth rate were isolated from the surrounding cells using a penicillin cup. The cells which were obtained were again inoculated in a 10 cmö culture dish and incubated at 33°C in a CO<sub>2</sub> incubator to form colonies. Colonies exhibiting a comparatively fast growth rate were isolated using a penicillin cup to obtain five lines of cells (TR-CSFB1, TR-CSFB2, TR-CSFB3, TR-CSFB4, TR-CSFB5).

TR-CSFB3 was deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and



Industries. The deposition number is FERM BP-6508.

【0015】

【Example 3】

Confirmation of large T-antigen proteins

Large T-antigen proteins in the five cell lines obtained in Example 2 were examined by the Western Blotting method (Experimental Medicine Separate Volume, Biotechnology Manual UP Series, "Cancer research protocol by the molecular biological approach", pages 108-115, YODOSHA Publishing Co., 1995). The five cell lines (the 10<sup>th</sup> generation) were cultured in a 90 mm $\phi$  culture dishes until saturation. The collected cells were solubilized using 1 mL of 3% SDS-PBS (pH 7.4) and unsolubilized fractions were removed by centrifugation (10,000 rpm, 10 minutes), and then the total amount of proteins was determined by the Bradford method (using the protein assay kit II of BIO-RAD Co.). The proteins were separated by the SDS polyacrylamide gel electrophoresis in the amount of 20  $\mu$ g each and transferred onto nitrocellulose membranes. The nitrocellulose membranes blocked by a 3% skimmed milk solution were reacted with an anti-SV40 large T-antigen mouse antibody (DP02-C, CALBIOCHEM Co.), as a primary antibody, and a HRP labeled anti-mouse IgG antibody A (Amersham Co.), as a secondary antibody, to detect the reactions specific to large T-antigen proteins using the ECL Western Blotting detection system (RPN2106M 1, a product of Amersham Co.). The results are shown in Table 1. As a result, the large T-antigen proteins were detected in all five cell lines obtained.

【0016】

【Table 1】

Cells	TR-CSFB1	TR-CSFB2	TR-CSFB3	TR-CSFB4	TR-CSFB5
T-Antigen	+	+	+	+	+

【0017】

【Example 4】

Confirmation of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase and GLUT-1 transport carrier

The cells obtained were cultured in a mono-layer and expression of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase and GLUT-1 transporter on the cell membrane was confirmed by confocal laser scanning microscopy observation of immunologically stained cells. The TR-CSFB3 cells obtained in Example 2 were cultured on a collagen coated cover glass of a 35 mmø dish (Falcon). After removal of the culture solution, the cells were washed with PBS, then 4 mL of a fixative (PBS containing 3% paraformaldehyde and 2% sucrose) was added. After allowing to stand at room temperature for 15 minutes, the cells were thoroughly washed with PBS. 2 mL of a blocking solution (Block Ace, manufactured by Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) was added and the mixture was allowed to stand for one hour at 37°C to effect blocking, followed by the reaction with a primary antibody (anti  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase  $\beta 2$  rabbit antibody, a product of UBI, or anti GLUT-1 rabbit antibody, a product of Chemicon) for one hour at room temperature. The resulting product was washed four times with PBS and reacted with a secondary antibody (FITC labeled anti-rabbit IgG, a product of Capel) for one hour at room temperature, followed by washing with PBS four times. Finally, labeled cells were sealed with a glycerol sealing solution (a 90% glycerol solution in PBS containing 0.1% (v/v) of Perma Fluor (a product

of Lipshaw)). The cover glass periphery was sealed with a manicure. A confocal laser scanning microscopy (CLSM; Zwiss LSM 410, manufactured by Zwiss) was used for the observation. As a result, expression of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase (Figure 1) and GLUT-1 were detected in TR-CSFB3 cells. In particular,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase which is present on the basolateral membrane side (a serous membrane side) in other epithelial cells was seen to be locally present in the apical side of the cell membrane, the cell lines obtained were identified to be choroid plexus epithelial cell lines. The same results were obtained with other cells.

【0018】

【Example 5】

Confirmation of proline transport capability

The concentration dependency of the resulting cells on the L-proline transport was examined to determine the L-proline transport capability. This was compared with the reported values of L-proline transport capability in the choroid plexus, thereby confirming that the resulting cell lines have functions as the choroid plexus epithelial cells. Specifically, TR-CSFB3 cells obtained in Example 2 were inoculated in a 24-well cell culture plate at a concentration of  $3 \times 10^5$  /well/mL and incubated for 24 hours at 33°C in a  $\text{CO}_2$  incubator to be the cells confluent. After removal of the medium by aspiration, the cells were washed with an uptake buffer (1) previously heated at 37°C (prepared from a solution which contains 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.4 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM Hepes, and 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  by bubbling 5%  $\text{CO}_2$ -95%  $\text{O}_2$  into the solution for 20 minutes and

adjusting the pH of the resulting solution to 7.4 with NaOH). The uptake buffer Solutions (1) containing proline at different concentrations were prepared by adding non-labeled L-proline to the solutions to make final concentrations of 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 mM. After the uptake reaction for 30 minutes and washing three times with PBS, 1 mL of PBS containing 1% Triton X-100 was added and the mixture was allowed to stand overnight to solubilize the cells. The radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (LS-6500 made by Beckmann Co.). In addition, the amount of proteins was determined using a protein assay kit manufactured by Bio-Rad Co. Using the plot formula for the uptake rate vs. the L-proline concentration ( $V = V_{max} \times [S] / (K_m + [S])$ ), wherein  $V_{max}$  indicates a maximum velocity constant,  $K_m$  indicates the Michaelis constant, and  $[s]$  is a substrate concentration), the  $K_m$  and the  $V_{max}$  for L-proline uptake were analyzed using the non-linear minimum square program (Yamaoka K. et al. (1981) J. Pharmacobio-Dyn., 4, 879-885). The results are shown in Figure 2. As a result, it was confirmed that the uptake of L-proline ( $[^3H]$ -L-proline) was concentration-dependent, the  $K_m$  was 1.5 mM, and the  $V_{max}$  was 2.4 nmol/min/mg protein. The value for  $K_m$  as determined was similar to the  $K_m$  value reported on rabbit choroid plexus of 1.1 mM (Coben L.A. et al. (1972) Brain Res., 30, 67-82). This confirms that the resulting cells possess the function of choroid plexus epithelial cell line.

[0019]

[Example 6]

### Inhibition of proline active transport by choline and ouabain

The L-proline uptake into the isolated choroid plexus is dependent on  $\text{Na}^+$ . Therefore, the  $\text{Na}^+$  dependency of the L-proline uptake by the cells obtained was confirmed, and then the cells were confirmed to have functions as the choroid plexus epithelial cells in the same way as in Example 5. However, because the experiment must be carried out under  $\text{Na}^+$ -free conditions, the uptake buffer (1) being replaced all  $\text{Na}^+$  in the buffer with coline were used. For the confirmation of the effect of ouabain, the uptake buffer (1) containing a tracer to which 1 mM of ouabain was added was used (because ouabain is an inhibitor of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase, the concentration gradient of  $\text{Na}^+$  is disappeared.). Both reactions were carried out for 30 minutes. The results are shown in Figure 3. It was also confirmed that L-proline uptake was inhibited as much as 98% under  $\text{Na}^+$ -free conditions. It was confirmed that 56% of L-proline uptake was inhibited by 1 mM ouabain. As a result, the L-proline uptake of TR-CSFB3 cells was confirmed to be  $\text{Na}^+$ -dependent. This confirms that the resulting cells possess the function of choroid plexus epithelial cell line.

【0020】

#### 【Effects of the Invention】

Established cells derived from choroid plexus epithelial cells are provided. The cells express a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, show localization of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase and GLUT-1 transporter in the cell membrane, and when cultured in a monolayer, show the localization of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase in the apical side. Also provided is a method of establishing

immortalized cells, comprising treating choroid plexus tissues of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of an SV40 temperature sensitive mutant tsA58 was produced by protease treatment.

Due to the capability of forming tight junctions among cells when cultured in a mono-layer on a porous flat membrane and the capability of reconstructing the blood-cerebrospinal fluid barrier with a inside-and-outside polarity in vitro, the established cells are useful for studying nutrition metabolism in the brain, studying permeation of drugs into the brain, and investigating the metabolism or permeation protection mechanism of substances in the cerebrospinal system. These cells are therefore useful in screening drugs regarding the safety and efficacy thereof, and developing a method for diagnosing and treating diseases relating to nutrition metabolism disorders and homeostatic functional disorders of the brain in cellular level studies.

#### **[Brief Description of the Drawings]**

##### **[figure 1]**

Figure 1 shows confocal laser scanning microscopy of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase of the established cell (TR-CSFB3) obtained in Example 4 of the present invention.

The upper photograph is a microscopic photograph of a plan view of the cell wherein  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase and GLUT-1 are seen to be expressed. The lower photograph is a microscopic photograph of a cross section view of the cell wherein  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase are seen localized in apical side.

**【figure 2】**

Figure 2 shows the proline active transport capability of the established cell obtained in Example 5 of the present invention.

**【figure 3】**

Figure 3 shows interference of the proline active transport capability of the established cell obtained in Example 6 of the present invention by choline and ouabain.

JP 10-296139

【Document Name】 Abstract

【Abstract】

【Problems】 To provide established cells.

【Means to be solved】

An established cell derived from choroid plexus epithelial cells, which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, shows localization of  $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase and GLUT-1 transporter in the cell membrane, and when cultured in a monolayer, shows the localization of  $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  ATPase in the apical side.

A method of establishing an immortalized cell comprising treating choroid plexus epithelium tissues of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced with protease and subculturing the resulting cells.

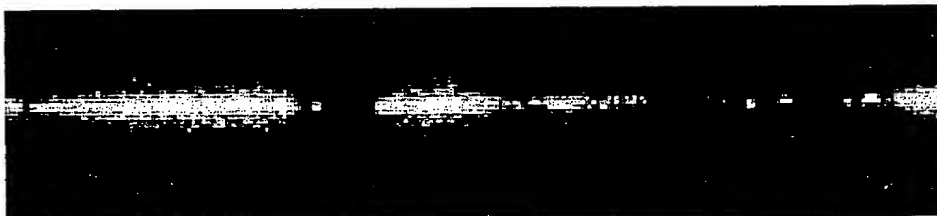
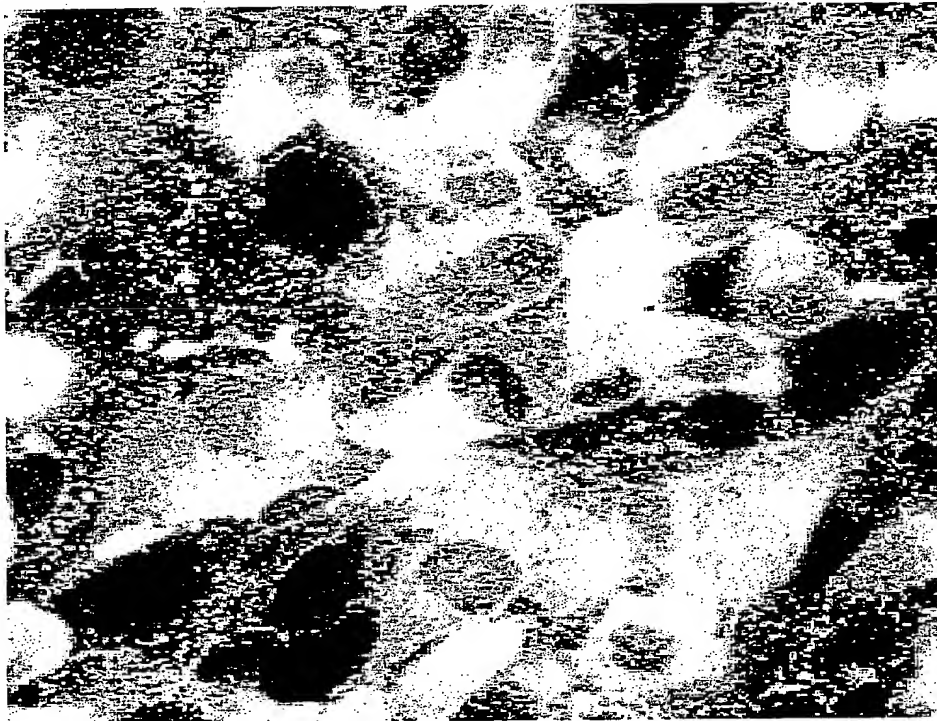
【Effect】

These cells are useful in screening drugs regarding the safety and efficacy thereof, and developing a method for diagnosing and treating diseases relating to nutrition metabolism disorders and homeostatic functional disorders of the brain in cellular level studies.

【Drawing】 Non



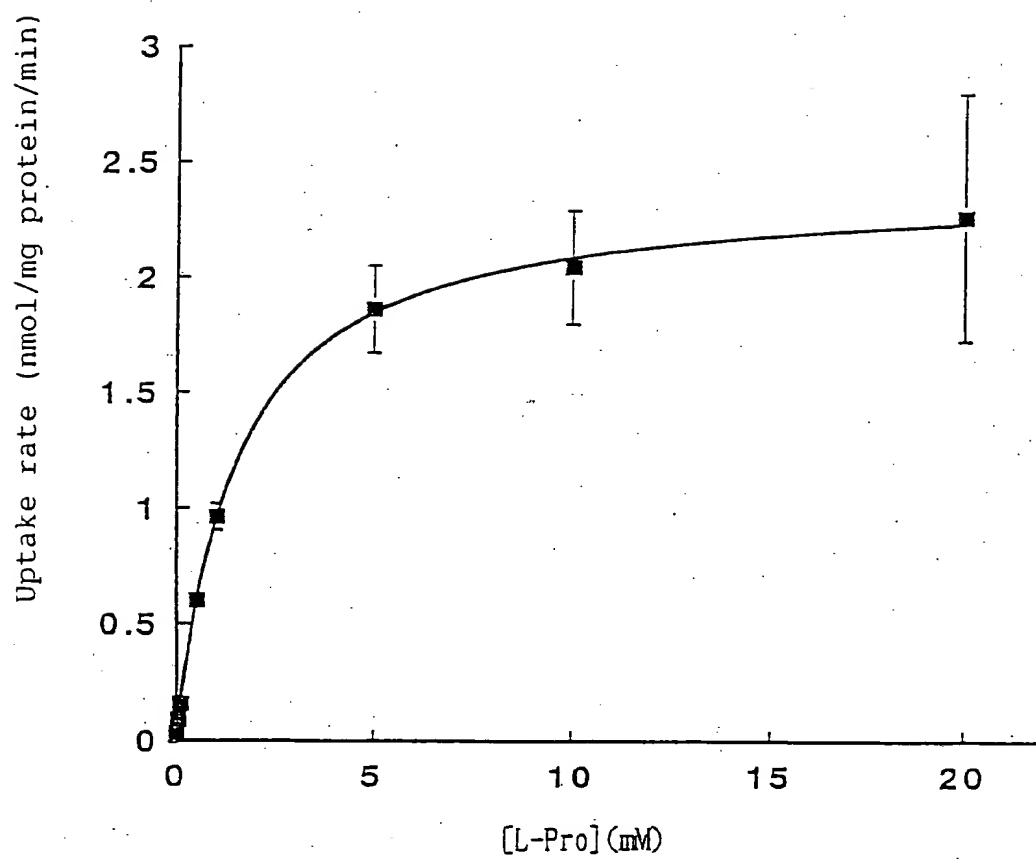
[ Figure 1 ]



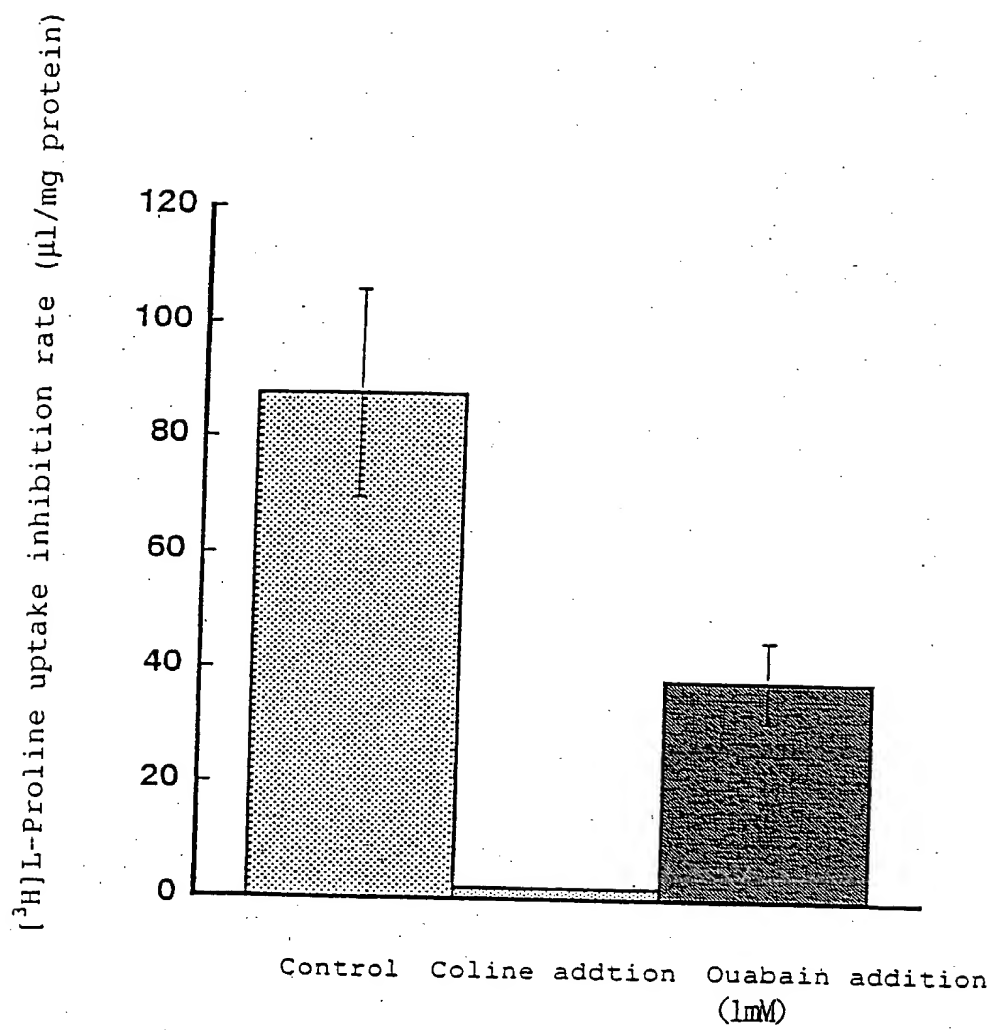
←apical side

←basolateral side

[ Figure 2 ]



[ Figure 3 ]





特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

## 原寄託についての受託証

氏名 (名称)

株式会社 ワイエスニューテクノロジー研究  
所 取締役研究所長 上田 正次

寄託者

あて名 〒

329-0512

栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林 5  
19番地

殿

### 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

TR-CSFB3

(受託番号)

FERM BP- 6508

### 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- ☐ 科学的性質  
☒ 分類学上の位置

### 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 10 年 9 月 18 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。

### 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、  
年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。  
そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

### 5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency for Industrial Science and Technology

所長 大箸 信一

Dr. Shinichi Oshichi Director-General

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1-3 番 3 号 (郵便番号 305-8566)

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305-8566, JAPAN

平成 10 年 (1998) 9 月 18 日

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**